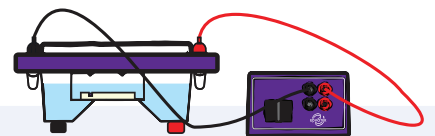

형질전환 실험세트3

(GFP를 이용한 박테리아의 형질전환 및 단백질 정제)

Exploring Biotechnology with GFP

ED303



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

※ 이 문서는 교육적 목적으로만 사용되어야 하며 그 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

실험 전 배경지식

DNA는 박테리아 사이를 이동할 수 있습니다.

DNA는 박테리아 사이를 주로 두 가지 방식으로 이동합니다 – 형질전환(transformation)과 접합(conjugation). 형질전환 중에 박테리아는 주변 환경에서 외부 DNA를 흡수합니다(Figure 1A). 대조적으로 접합(conjugation)은 두 박테리아 사이의 직접적인 접촉이 필요합니다. DNA 조각은 한 개의 세포(공여체: donor)에서 복사되어 다른 세포(수용체: recipient)로 이동됩니다(Figure 1B). 이 두 경우 모두 박테리아는 딸세포(daughter cell)에 의해 유전될 수 있는 새로운 유전정보를 획득합니다.

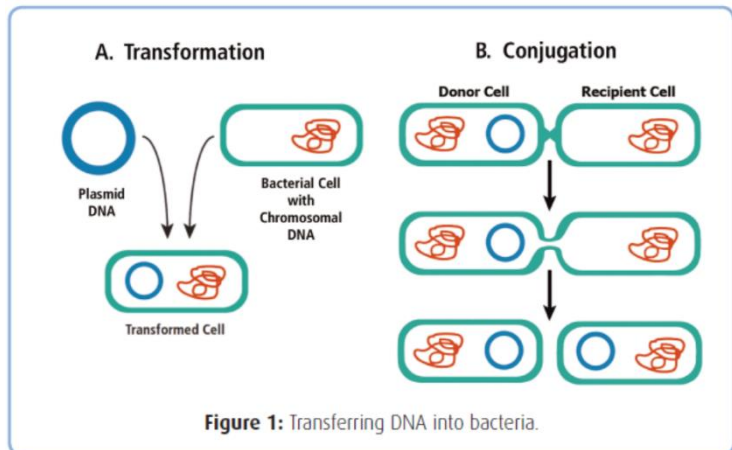


Figure 1: Transferring DNA into bacteria.

1928년에 Frederick Griffith는 비병

원성(non-pathogenic) 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)이 열에 의해 사멸된 병원성 균주와 섞인 후 생쥐를 죽일 수 있음을 관찰하고 처음으로 형질 전환을 발견하였습니다. 비병원성 균주가 병원성 균주로 전환되었기에 이러한 독성의 변이를 형질전환이라고 하였습니다. 1944년에 Oswald Avery와 그의 동료들은 어떤 것이 형질전환을 가져왔는지 밝히기 위해서 폐렴구균의 약성 균주에서 DNA, RNA, 단백질을 정제하였습니다. 각 성분은 비병원성 박테리아 균주와 혼합되었고 그 중 DNA에 노출된 수용세포만이 병원성으로 전환되었습니다. 이러한 형질전환 실험은 이 독성이 어떻게 전달되는지 밝혀냈고 DNA를 유전 물질로 인식하게 하였습니다.

정확한 형질전환 방식은 박테리아 종마다 다를 수 있습니다. 예를 들어 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)는 이중 가닥의 DNA 포착을 위해 막결합 소낭(membrane-bound vesicle)을 사용합니다. 대조적으로 폐렴구균 세포는 단일 가닥 DNA 분자를 받을 수 있는 수용인자(competence factor)를 발현합니다. 실험실에서 과학자들은 DNA를 삼입하여 형질전환이 되도록 수용성세포(Competent cell)를 유도할 수 있습니다. 이를 위해 DNA는 특정 화학물질(칼슘, 루비듐, 염화 마그네슘)이 있는 상태에서 세포에 추가되고 부유물(suspension)에 열충격(heat shocked-차가운 온도에서 뜨거운 온도로 이동)을 가하게 됩니다. 화학이온과 급격한 온도 변화로 세포벽과 막의 투과성을 변화시켜 DNA 분자가 세포에 들어갈 수 있도록 합니다.

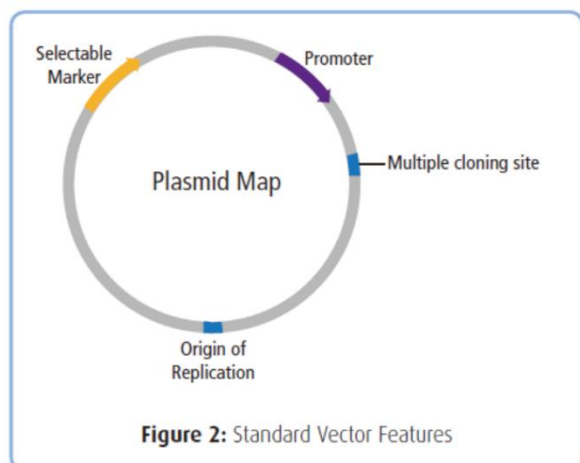


Figure 2: Standard Vector Features

재조합 DNA 기술을 이용한 유전공학

많은 박테리아는 이중 나선 DNA의 작은 원형 조각들 상에 여분의 비필수적 유전자와 추가로 그들의 염색체 DNA를 가집니다. 이 DNA 조각들은 플라스미드(plasmid)로 불리며 유익한 유전자를 교환할 수 있게 해줍니다. 예를 들어 암피실린(ampicillin)에 대한 항생제 내성을 주는 효소인 β -lactamase를 코딩하는 유전자는 플라스미드의 박테리아 사이에서 이동될 수 있습니다. 암피실린은 세포벽 합성을 방해하여 세포 성장을 억제하지만 플라스미드를 포함한 세포는 항생제를 분해하기 위한 β -lactamase를 분비할 수 있습니다. 따라서 이 유전자를 발현하는 박테리아는 암피실린이 있더라도 성장할 수 있습니다.

과학자들은 여러 다른 소스에서 유전자를 결합하여 recombinant DNA(재조합 DNA, Figure 2)로 알려진 새로운 박테리아 플라스미드를 만들 수 있습니다. 벡터라고 불리는 특수 플라스미드는 다음과 같은 특징이 있습니다:

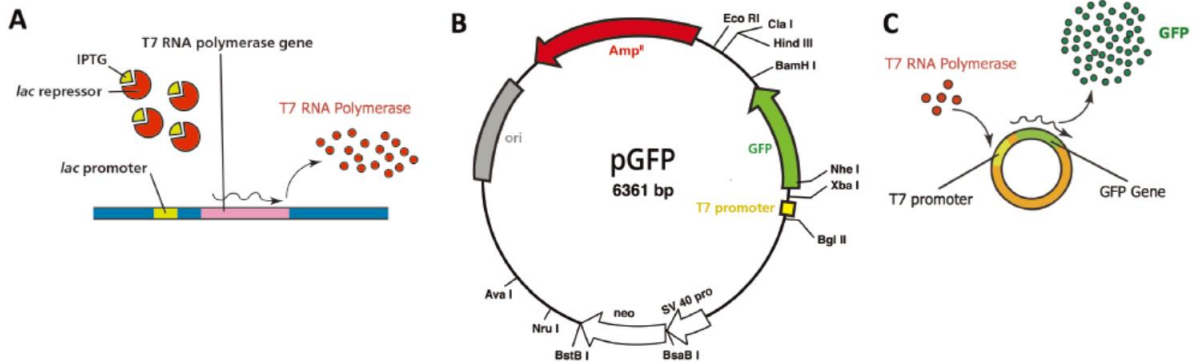
1. 복제의 기원: 박테리아가 플라스미드를 복제할 수 있도록하는 DNA 서열
2. 다중 복제 부위: 많은 특정 제한효소 사이트를 가지고 플라스미드로 특정 유전자가 쉽게 도입이 가능한 짧은 DNA 서열
3. 프로모터(Promoter): 일반적으로 유전자의 코딩 서열 바로 앞(업스트림)에 위치한 DNA 서열. 프로모터는 전사를 시작할 수 있는 유전자 서열의 시작 부분에 RNA 중합효소를 구성합니다.
4. 선택가능한 마커: 특정 항생제(일반적으로 암피실린, 카나마이신, 테트라사이클린)에 대한 내성을 코딩하는 유전자. 마커를 가진 세포만이 항생제가 들어있는 배지에서 자라도록하여 연구자들이 플라스미드가 있는 세포를 쉽게 구별 할 수 있습니다.

유전자 발현의 조절

재조합 DNA 기술은 DNA 및 단백질 생물학을 조사하는 연구자들이 광범위하게 사용합니다. 과학자들은 유도성 프로모터라고하는 유전적 "온/오프" 스위치를 포함하는 벡터를 사용하여 단백질의 발현을 조절할 수 있습니다. 이러한 서열은 적절한 유도인자가 있어야 유전자 발현이 시작되기에 정확한 제어가 가능합니다. 대다수의 일반적 유도성 프로모터는 arabinose, tetracycline, IPTG와 같은 저분자가 있는 곳에서 활성화됩니다. 이 실험에서는 IPTG를 사용해 형질전환된 세포에서 GFP(Green Fluorescent Protein)발현을 조절합니다.

이 실험에서 사용되는 유전자 발현 메커니즘은 두 가지입니다: T7 RNA Polymerase를 발현할 수 있는 유전자 조작 박테리아 **T7 발현 호스트**와 **발현 벡터**입니다. Edvotek GFP/Chromogenic host E.coli 박테리아는 lac 프로모터의 제어하에 T7 RNA polymerase를 발현하도록 유전적으로 조작되

있습니다(Figure 3A). 정상적인 상황에서 박테리아는 이 프로모터에 결합하고 T7 polymerase 발현을 막는 lac 억제자라고 불리는 단백질을 만듭니다. 그러나 IPTG는 lac 억제자를 결합하고 비활성화하여 T7 중합효소가 발현되도록 합니다. 그래서 박테리아 배양에 IPTG를 추가하여 T7 중합효소의 발현을 시작할 수 있습니다.



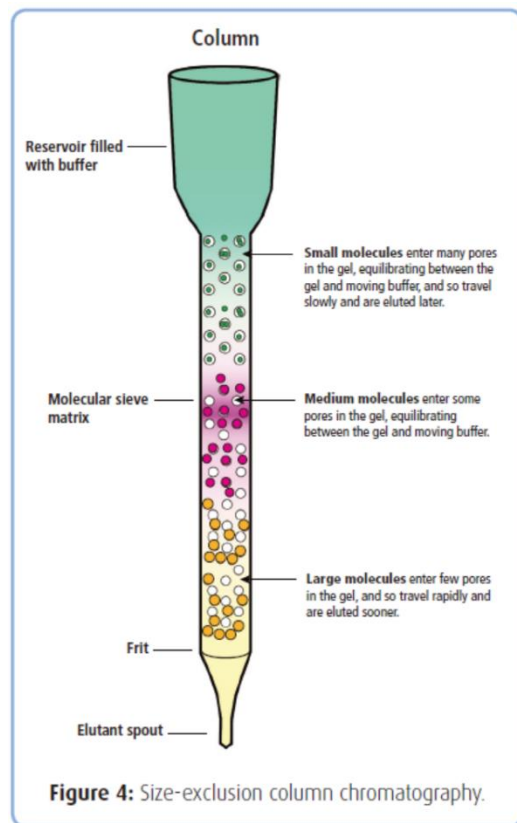
이 실험에서 pGFP 발현 벡터는 T7 발현 호스트와 함께 작동되도록 설계되었습니다. 이 벡터는 암피실린에 내성을 제공하는 β -lactamase 유전자와 T7 프로모터(Figure 3B)의 제어하에 GFP 유전자를 포함하고 있습니다. β -lactamase는 단백질을 지속적으로 생산할 구성적 프로모터(constitutive promoter)에 의해 제어됩니다. 반대로 T7 중합효소가 없으면 GFP 유전자는 발현될 수 없으며 세포는 형광으로 발색되지 않습니다. 그러나 IPTG가 존재하면 lac 억제자가 비활성화되고 T7 중합효소가 발현될 수 있습니다. 이 중합 효소는 T7 프로모터를 구체적으로 인식하고 많은 양의 GFP mRNA를 전사합니다(Figure 3C). 마지막으로 mRNA는 세포가 형광을 띄도록 GFP 단백질을 생산하는 번역(translation)을 하게 됩니다.

Green Fluorescent Protein

E.coli를 형질전환하는데 사용할 pGFP 플라스미드는 높은 수준의 GFP를 발현하도록 설계되었습니다. 이 작은 단백질(약 27킬로달톤)은 청색광을 흡수하고 이에 대응하여 녹색광을 방출하는 능력을 가지고 있습니다. 형광으로 알려진 이 활성은 눈에 보이는 빛을 생산하기 위한 어떠한 추가적인 특수기질, 유전자 산물, 보조인자의 사용이 필요하지 않습니다.

GFP는 1970년에 해파리 *Aequorea victoria*에서 처음 분리되었습니다. 과학자들이 DNA 서열을 확인한 후 유전공학에 사용하여 형광 단백질을 E.coli 및 선충류 *Caenorhabditis elegans*와 같은 다른 유기체에도 적용할 수 있었습니다. 과학자들은 또한 빛 생산을 담당하는 단백질 내의 특별한 구조인 색소포(chromophore)의 행동을 변경한 GFP의 특정 아미노산 치환을 찾아냈습니다. 다른 변화는 빛의 흡수와 방출의 다른 패턴을 불러일으켜 과학자들이 가지각색의 형광 단백질을 개발할 수 있게 합니다.

GFP 및 관련 형광 단백질은 세포 분자 생물학에서 필수적인 도구가 되었습니다. DNA 복제방법을 이용해 형광단백질로 단백질을 표식할 수 있고 세포에서 발현시킬 수 있습니다. GFP 표지 단백질은 자외선으로 추적이 가능하여 단백질 정제실험을 단순화할 수 있습니다. 연구자들은 세포에서 단백질을 찾을 수 있는 위치를 결정할 수 있습니다. 마찬가지로 GFP를 리포터처럼 이용해 살아있는 세포 내에서 발생하는 생물학적 과정을 관찰할 수 있습니다. 예를 들어, 유기체모델 제브라 피쉬(Danio rerio)안에 혈관 단백질을 형광생으로 표지하여 혈관 성장 패턴과 네트워크를 추적할 수 있습니다. 과학자들은 또한 유전자가 발현되는 시기와 위치의 패턴을 관찰할 수 있도록 GFP 코딩 서열을 조절 DNA서열에 부착합니다.



컬럼 크로마토그래피를 이용한 GFP 정제

발현 벡터로 형질전환되면 E.coli 박테리아는 재조합 단백질을 생산하는 생물학적 공장으로 작동합니다. 매우 높은 활성 프로모터의 경우에 세포내의 모든 단백질의 최대 70%까지 표적단백질로 이뤄질 수 있습니다.

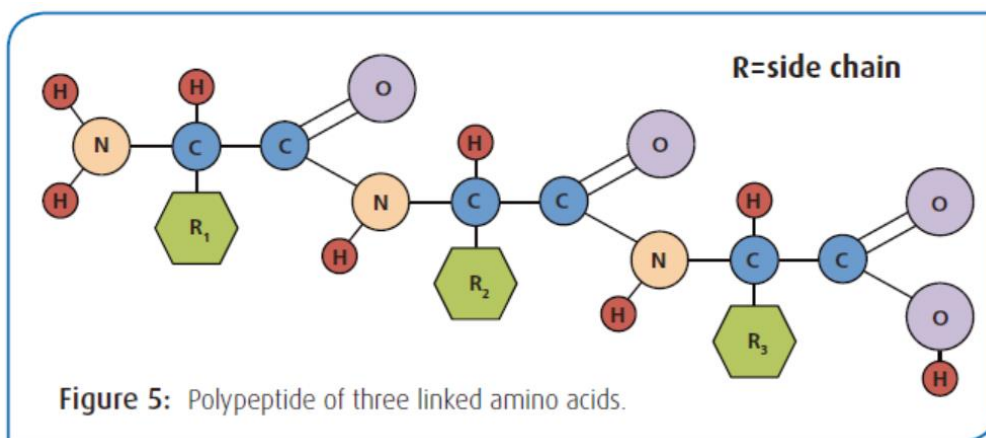
이러한 높은 발현에도 불구하고 세포에는 제거가 필요한 많은 양의 추가 단백질들이 들어있습니다. 올바른 정제법을 선택하면 최종 용액의 순도를 최적화할 수 있습니다. 가장 일반적인 정제방법 중 하나는 컬럼 크로마토그래피입니다.

컬럼크로마토그래피에서 박테리아 용해물(lysate)은 단백질 분리에 사용되는 반고체 물질 분자매트릭스가 들어있는 길고 얇은 컬럼에 추가됩니다(Figure 4). 이 매트릭스는 프리트(frit) 이나 멤브레인 또는 다공성 디스크로 채워져있으며 버퍼나 용해된 용질이 통과할 수 있습니다. 이 실험에 사용된 방법인 사이즈 배제 크로마토그래피에서 매트릭스는 미세한 기공과 내부 채널을 가집니다. 분자가 클수록 모공(pore)를 통과하기 어려워집니다. 대신 큰 분자일수록 비드(bead) 주위와 그 사이에서 흐르는 경향이 있습니다. 작은 분자일수록 채널의 미로와 베드(bed) 안의 모공에서 더 많은 시간이 소요됩니다. 결과적으로 큰 분자량의 단백질은 매트릭스를 통해 빠르게 이동하고 컬럼에서 먼저 나오거나 용출됩니다.

Polyacrylamide gel을 이용한 GFP 정제 분석

단백질을 정제한 후 추가적으로 연구할 수 있습니다. 단백질 분석을 위해 연구자들은 PAGE(PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)라는 기술을 사용합니다. 이것은 분자의 분자량과 함께 발현과 순도에 대한 정보를 제공해줍니다. PAGE는 acrylamide와 bis-acrylamide polymer를 사용하여 미세한 기공 및 채널 네트워크가 있는 겔을 만듭니다.

형질전환된 박테리아가 용해되고 크로마토그래피로 정제되면 질량분석법 또는 SDS-PAGE와 같은 기술을 사용하여 단백질의 존재와 순도를 확인할 수 있습니다. 겔의 기공(pore)크기는 농도와 교차결합정도로 조절될 수 있습니다. 단백질은 겔의 구멍을 통해 이동되며 작은 단백질은 큰 단백질보다 더 멀리 이동합니다.



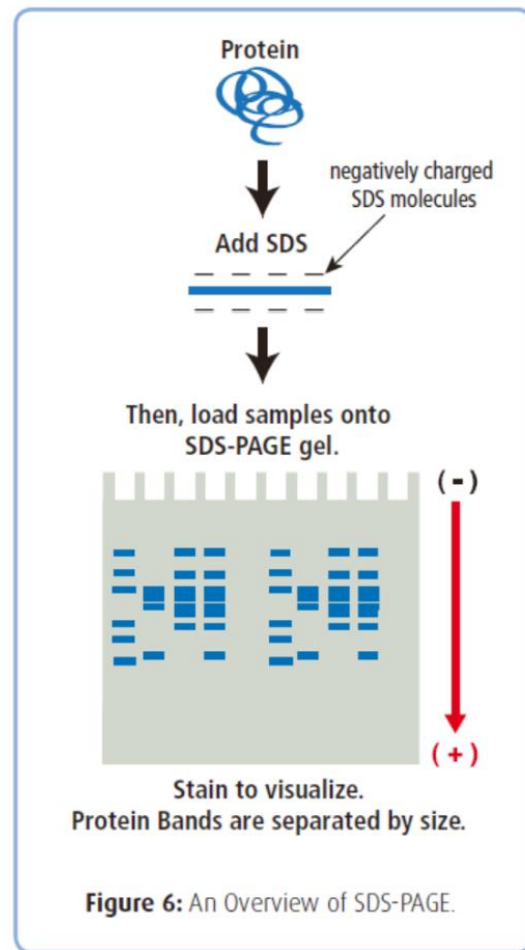
전기영동을 위한 단백질 변성(denaturation)

단백질은 아미노산으로 알려진 수백에서 수천 개의 작은 유기 화합물로 구성된 폴리머입니다. 단백질 합성 중에 특정 아미노산 서열이 함께 연결되어 연속적인 사슬을 형성합니다. 사슬 안의 인접한 아미노산들은 펩타이드 결합에 의해 서로 연결됩니다. 이러한 강력한 공유 결합은 한 아미노산의 카르복실기와 두 번째 아미노산의 아민기를 연결합니다(Figure 5). 연결된 아미노산 사슬은 폴리펩티드로 알려져 있으며 하나 이상의 폴리펩티드가 결합하여 단백질을 만듭니다. 아미노산 서열은 각 단백질의 분자량, 전하, 모양 같은 특징을 알려줍니다. 여러 폴리펩티드 사이의 꼬임, 접힘, 상호작용을 가진 3차원 배열은 단백질 기능에 중요합니다. 예를 들어서 단일 아미노산만 돌연변이 시키면 GFP를 BFP(Blue fluorescent protein)으로 전환할 수 있습니다.

단백질은 복잡한 모양과 뚜렷한 전하를 가지고 있기에 전기영동에 적합합니다. 두 가지 모두 단백질의 겔이동에 영향을 끼칩니다. 구조적 차이로 인해 비슷한 분자량을 가진 두 개의 단백질은 서로 다른 속도로 이동합니다. 복잡하고 확산된 단백질은 콤팩트한 형태의 단백질보다 겔을 통해 느리게 이동합니다. 마찬가지로 양전하와 음전하를 띤 단백질은 겔의 전기장을 통해 다른 방향으로 이동합니다. 과학자들은 단백질을 변성시키고 복잡한 구조를 제거하고 천연 단백질의 전하를

중화시키는 화학물질을 사용해 이러한 문제를 해결할 수 있습니다.

SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)는 아미노산 간의 상호작용을 방해하는데 사용되는 일반적인 시약입니다. SDS분자는 음으로 하전된 황산염기에 결합된 탄화수소 사슬로 구성됩니다. 단백질과 함께 배양하고 가열하면 SDS는 단백질의 3차원구조를 펼칩니다(Figure 6). 단백질에서 더 강한 이황화결합을 끊기위해 과학자들은 β -mercaptoethanol (β -ME) 또는 Dithiothreitol (DTT)과 같은 환원제를 사용합니다. 아미노산 구성과 서열은 동일하게 유지되지만 특정 3차원 구조가 바뀌었기에 그 단백질은 더 이상 생물학적 활성을 갖지 않습니다. 이로서 준비된 단백질 샘플은 아크릴 아미드 겔에서 분리될 수 있습니다. 이 방법을 SDS-PAGE라고 합니다. 본래의 샘플과 변성된 PAGE샘플의 결과를 비교하여 단백질의 모양, 구조, 전하에 대한 정보를 얻을 수 있습니다.



실험요약

이 실험에서 competent E.coli는 암피실린 내성과 GFP 유전자를 가진 플라스미드인 pGFP로 화학적으로 형질 전환이 됩니다. 형질 전환체는 LB-암피실린 플레이트를 사용해 플라스미드 존재유무 확인 후 선별됩니다. 형질 전환된 박테리아는 유도성 프로모터의 유용성 설명을 위한 IPTG가 있거나 없을 때의 GFP 발현에 실험됩니다. 많이 발현된 박테리아는 배양되고 GFP는 크로마토그래피를 사용해 정제됩니다. 마지막으로 정제된 샘플은 SDS-PAGE에 의해 분석됩니다.

교사 참고 사항 및 일정

(주의: 하룻밤 동안의 배양이 필요한 경우도 있습니다. 하루에 여러 실험단계를 진행할 수도 있습니다.)

실험 시작 최소 2일 전 준비

- Agar 플레이트 준비 (E.coli 준비 전 1일에서 2주)
- E.coli 세포 준비 (18-22 시간 배양)
- DNA와 버퍼 준비

모듈 I : pGFP를 이용한 E.coli 형질전환

Day 1 (실험 당일)

- 37 °C 와 42 °C 항온수조 온도 맞추기
- 37 °C에 인큐베이션 오븐 맞추기
- 각 조에 얼음과 차갑게 유지한 시약 준비
- 학생이 형질전환 시킨 세포와 플레이트 하룻밤 동안 배양

Day 2 (실험 다음날)

- 형질전환체와 대조군 학생관찰
- 형질전환 효율성 학생계산
- 모듈 II를 위해 GFP 형질전환체를 가진 플레이트 유지
-

모듈 II : GFP 분리

Day 3 (실험 당일)

- 기기 조립
- GFP 정제를 위한 형질전환된 세포 배양

Day 4 (실험 당일)

- Lysis 버퍼 준비 및 55 °C로 항온수조 맞추기

- 학생이 형질전환된 세포와 Cell Lysis 획득

모듈 III : 컬럼 크로마토그래피를 통한 GFP의 정제

Day 5 (실험 당일)

- 매트릭스 일루션버퍼 준비 및 조립
- 학생이 컬럼 크로마토그래피 수행

모듈 IV : SDS-Gel 전기영동을 이용한 GFP 분석

Day 6 (실험 당일)

- 전기영동 버퍼, protein용 마커, 염색약 준비
- 학생이 GFP 샘플을 denaturing
- 학생이 SDS-Polyacrylamide 겔을 이용한 GFP 분석

실험 소요 시간

	할 일	시기	요구 시간
	LB Agar 플레이트 준비	사용 2-14 일 전	1 시간
모듈 I	E.coli Source 플레이트와 Control GFP 플레이트 준비	실험 전날	20 분 도말, 18-22 시간 배양
	pGFP, CaCl ₂ , recovery broth 분주하기	실험 하루에서 30 분 전	30 분
	항온수조 37°C, 42°C, 배양기 37°C 맞추기	실험 전 언제든지	10 분
모듈 II	lysis 버퍼 분주, 기기조립과 항온수조 55°C로 맞추기	실험 전 언제든지	30 분
모듈 III	Elution 버퍼 준비 및 분주	실험 전 언제든지	10 분
	Molecular Sieve Matrix 준비 및 소분 만약 control GFP 추출이 필요하다면 이 부분에서 소분	실험 60 분 전	60 분
모듈 IV	Protein Denaturation 용액과 Native Protein 용액 준비 및 소분	실험 전 언제든지	10 분
	단백질용 마커 준비	실험 전이나 실험하는동안	30 분
	전기영동 버퍼 준비	실험 전 언제든지	10 분
	염색과 탈색 용액 준비	실험 전 언제든지	10 분

실험 팁

1. 많은 수용가능한 세포 배양
 - A. CaCl₂를 실험 내내 얼음처럼 차갑게 유지시킵니다.
 - i. 전날 밤 냉장고나 냉동고에 배양
 - ii. 잘게 부순 얼음에 보관
 - iii. 학생들이 잡을 때 튜브의 윗쪽 부분으로만 잡도록 합니다.
 - B. 까다롭게 콜로니를 선택합니다.
 - i. 최고의 박테리아는 중간 크기 (1-1.5mm)
 - ii. 18-22시간 배양된 소스 플레이트
 - C. Agar는 형질전환을 저해할 수 있습니다. 박테리아 콜로니를 수집할 때 Agar가 묻지 않게 콜로니를 부드럽게 수집하도록 합니다.
 - D. 루프에 달린 세포가 용액안으로 잘 들어가는지 확인합니다. CaCl₂의 표면 장력을 활용하면서 루프를 위아래로 이동합니다.
 - E. 박테리아 세포가 최대한 차가운 CaCl₂와 외세포 플라스미드에 접촉하도록 시간을 할애하여 고형물이 완전히 분해되도록 합니다.
2. 적절한 양의 외래 DNA를 가져옵니다.
 - A. 플라스미드가 너무 적거나 너무 많으면 형질전환 효율성이 떨어질 수 있습니다.
 - B. DNA가 없는 음성(-)DNA는 형질 전환되지 않는 세포가 암피실린에 민감하게 반응하는 것을 입증하기 위한 대조군으로 사용됩니다. 숙주세포 생존력과 적절한 배양 조건 확인을 위한 대조군으로도 사용됩니다.
3. 열 충격 단계 실행
 - A. 얼음과 42°C 항온수조 온도차이를 최대화합니다.
 - i. 학생들이 튜브가 얼음과 항온 수조 사이를 오갈때마다 신속하게 하도록 합니다.
 - B. 얼음은 분쇄가 되어있으면 튜브와 용액이 빠르게 온도가 낮아지는데 도움이 됩니다.
4. 세포가 회복하고 성장하는데 필요한 도구를 제공합니다.
 - A. 형질전환된 박테리아는 아직 암피실린 내성을 제공하는 단백질 B-lactimase를 생성하기 전이기에 recovery broth에는 암피실린이 포함되어있지 않습니다. 이것은 다음 단계에서 만들어집니다.

- B. 형질전환된 콜로니는 깨진 Agar에서는 잘 자라지 않습니다. 학생들이 루프 사용 시에 부드럽고 조심스럽게 사용하도록 합니다.
- C. 금방 만들어진 아가플레이트는 세포용액을 흡수하는데 5분이상이 걸릴 수 있습니다. 플레이트 표면에 용액이 완전히 흡수가 되도록 뒤집기 전에 최대 30분 동안 기다립니다.

LB-Agar 플레이트 준비

작은 병에 들어 있는 ReadyPour LB Agar는 5개의 큰 LB 소스 플레이트와 10개의 작은 대조군 플레이트를 만드는데 사용됩니다. 큰 병은 20개의 작은 LB/Amp 플레이트, 30개의 작은 LB/Amp/IPTG, 2개의 큰 LB/Amp/IPTG 대조군 플레이트를 만들게 됩니다.

SUMMARY OF POURED PLATES						
Module	Qty.	Plate Size	Name	Description	Volume	Markings
Module I	5	Large	LB Source Plates	ReadyPour™ medium	10 mL each	None
Module I	10	Small	LB Plates	ReadyPour™ medium	5 mL each	None
Module I	20	Small	LB/AMP Plates	ReadyPour™ with AMP	5 mL each	One Stripe
Module I & II	30	Small	LB/AMP/IPTG Plates	ReadyPour™ with AMP & IPTG	5 mL each	Two Stripes
Module II	2	Large	GFP Control Plates	ReadyPour™ with AMP & IPTG	10 mL each	Two Stripes

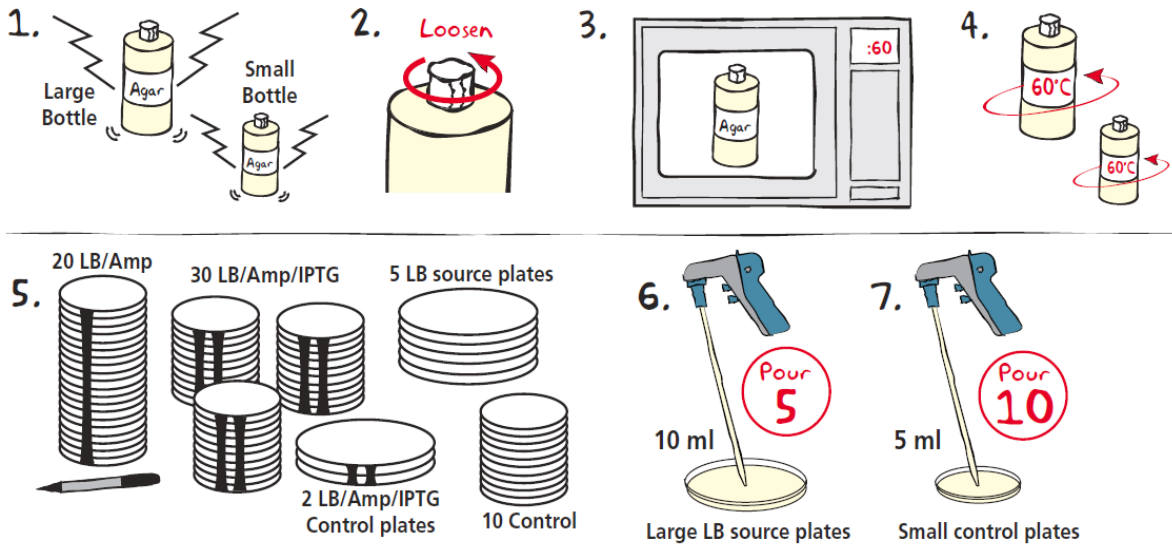
LB Agar 플레이트를 준비하는 동안 모든 단계에서 멸균상태를 유지하는 것이 중요합니다.

멸균처리된 10mL 피펫을 사용하여 지정된 부피의 배지를 각 페트리 플레이트로 옮깁니다. 거품이 생기지 않도록 조심스럽게 피펫팅합니다.

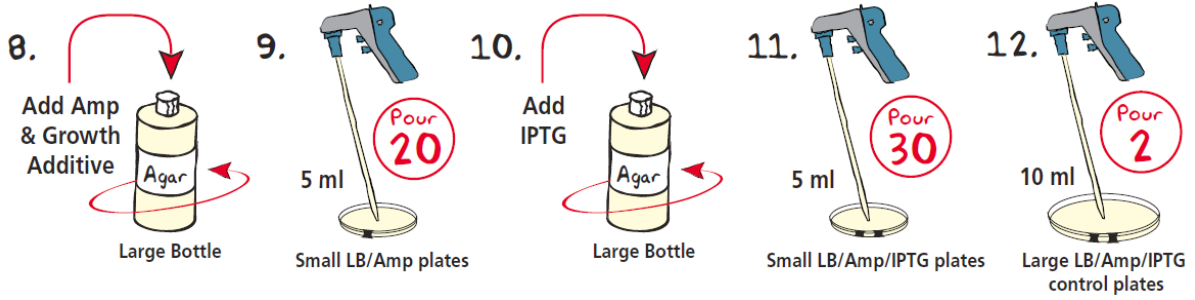
페트리 플레이트를 앞뒤로 흔들어 완전히 덮습니다. 거품이 남아있다면 불꽃에 통과시켜 제거할 수 있습니다.

페트리 플레이트를 덮고 배지가 밤새 굳도록 합니다.

참고: 피펫 펌프가 없는 경우 병에서 직접 플레이트로 부을 수 있습니다. 접시 바닥이 LB Agar의 얇은 층으로 덮일 때까지 천천히 따르십시오. 병이 뜨거울 수 있으므로 주의합니다.



1. 크고 작은 ReadyPour LB Agar 병 두 개를 손으로 세게 짜고 흔들어가며 안의 한천 덩어리를 잘게 부수십시오.
2. 병의 뚜껑을 돌려서 풀어 놓은 상태로 뚜껑은 살짝 올려놓기만 합니다. 가열 중에 증기가 배출될 것이며, 폭발할 수 있으므로 꼭 뚜껑은 다 풀고 올려놓기만 합니다.
3. 한 병에 한 번 60초 동안을 가열합니다. 조심스럽게 꺼내 병을 살살 돌립니다. 30초 간격으로 계속 전자레인지로 가열하여 완전하게 용액으로 녹을 때까지 반복합니다.
 **주의: 절대 병안의 한천이 끓지 않게 합니다. 거품이 생기기 시작하면 가열을 중지합니다.
4. ReadyPour Agar 병을 부드럽게 휘저어 60°C로 식힙니다.
5. 식히는 동안 배양 플레이트를 꺼내 다음과 같은 방법으로 표기합니다.
 - A. 30개의 작은 플레이트를 반듯하게 쌓습니다. 두 개의 줄을 긋습니다. 이 30개의 플레이트가 LB/Amp/IPTG 플레이트가 됩니다.
 - B. 2개의 큰 플레이트를 반듯하게 쌓습니다. 두 개의 줄을 긋고 "Control"을 표기합니다. 모듈II 에 필요할 때 형질전환 대조 플레이트로 사용됩니다.
 - C. 나머지 10개의 작은 플레이트는 라벨링을 하지 않도록 합니다. 이것은 대조 LB 플레이트가 될 것입니다.
 - D. 남은 5개의 큰 플레이트도 라벨링을 하지 않도록 합니다. 이것은 LB 소스 플레이트로 사용됩니다.
6. 10mL 피펫으로 5개의 큰 LB 소스 플레이트에 작은병의 Ready-Pour Agar용액을 넣습니다.
7. 동일한 10mL피펫으로 작은 병의 agar용액을 10개의 작은 라벨링하지 않은 대조 플레이트에 넣습니다.



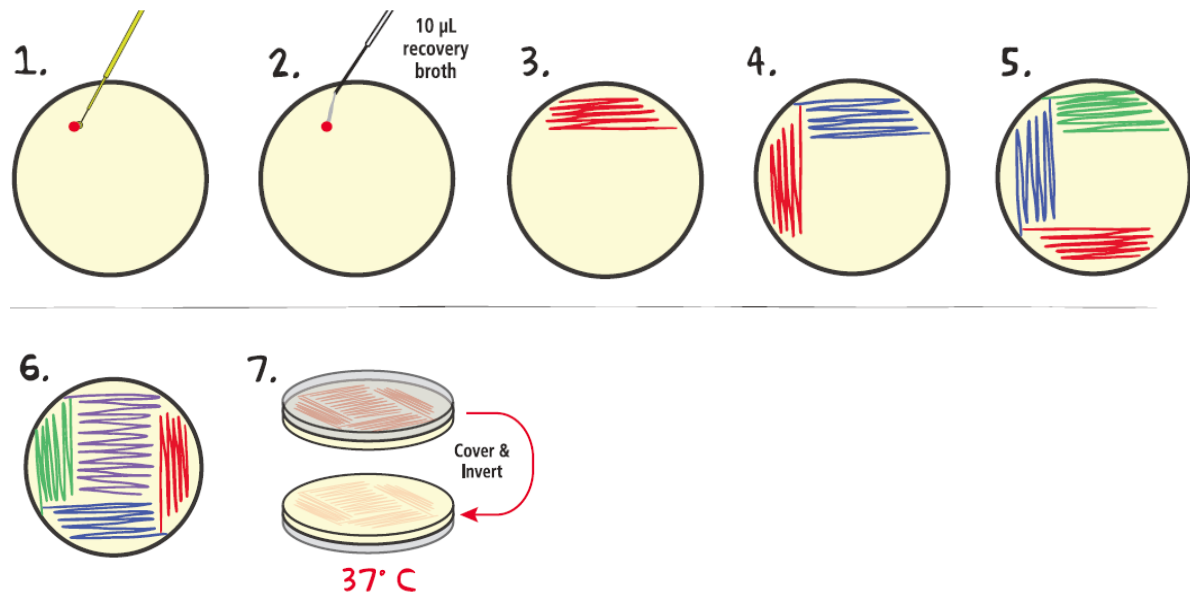
REMINDER:
Only add reagents to
cooled agar (60° C)!

8. Ampicillin (A 튜브)의 모두를 Growth Additive 병에 모두 넣고 섞습니다. 이 용액 모두를 다시 ReadyPour Agar 큰 병에 넣습니다. 뚜껑을 닫고 돌려가며 섞습니다. 이 때 거품이 생기지 않도록 합니다.
9. 10mL 피펫으로 위에서 만든 용액을 5mL씩 20개의 한 줄로 표기한 작은 LB/Amp 플레이트에 넣습니다.
10. IPTG 용액(B 튜브) 모두를 ReadyPour Agar 큰 병에 넣고 잘 흔들어 섞습니다. IPTG의 용량이 작기 때문에 마이크로 피펫을 사용하는 것이 좋습니다.
11. 10mL 피펫으로 이 용액을 5mL씩 30개의 두줄로 표기된 작은 LB/Amp/IPTG 플레이트에 넣습니다.
12. 남은 위 용액을 10mL씩 2개의 두줄로 표기된 큰 LB/Amp/IPTG 큰 플레이트에 넣습니다.
13. 뚜껑을 닫고 LB-agar 플레이트가 굳을 때까지 기다립니다. 좋은 결과를 위해 하룻밤정도 실온에 두는 것을 추천합니다.
14. 4°C 냉장고에서 보관이 가능하며 보관시에는 뒤집은 상태로 비닐 봉지에 넣어서 마르지 않도록합니다. 이렇게 보관 후 사용시에는 37°C배양기에서 30분정도 데워서 사용합니다.



E.coli 소스 플레이트 준비

최상의 결과를 위해 E.coli 소스플레이트는 실험 시작 18-22시간 전에 도말되는 것이 좋습니다. 하지만 24시간이 넘지 않도록 합니다.



1. 멸균 접종 루프를 사용하여 E.coli GFP Host 바이알 병에서 한 개의 BactoBead를 꺼냅니다. 한 개의 비드를 큰 페트리플레이트(LB 소스 플레이트)에 올리고 뚜껑을 닫습니다. 공기 중의 수분 노출을 피하기 위해 바이알 병을 막아놓습니다.
2. 10µL의 recovery broth를 비드에 떨어뜨립니다.
3. 용해된 BactoBead를 루프를 이용해 앞뒤로 도말하여 1차 줄무늬를 만듭니다. 루프가 배지의 다른 곳에 닿지 않게 주의합니다.
4. 플레이트를 90도 회전시킵니다. 1차 줄무늬의 끝부분에서 시작하여 다른 깨끗한 부분으로 지그재그 여러 번 도말하여 2차 줄무늬를 만듭니다.
5. 플레이트를 한 번 더 회전시켜 도말합니다.
6. 한 번 더 플레이트를 회전하여 도말합니다. 이 때 도말한 줄무늬에서는 따로 분리된 콜로니가 생성되어야 합니다.
7. 플레이트 뚜껑을 덮고 18-22시간 동안 37도의 배양기에 뒤집어서 배양합니다. 24시간이 넘어가면 형질전환효율이 떨어지기에 너무 오래 놔두지 않도록 합니다.
8. 각 플레이트에 새로운 루프를 사용해 5개의 대형 LB 소스 플레이트에 위의 과정과 같이 도말합니다.

참고: 이상적인 콜로니는 1-1.5mm 크기입니다. 너무 많이 뭉쳐있다면 루프로 작게 떼서

CaCl₂용액에 넣도록 합니다.

9. 두 개의 LB/Amp/IPTG 플레이트를 가져옵니다

10. E.coli pt-GFP BactoBead를 사용하여 1-7단계를 두 개의 플레이트에 실행합니다.

참고: 이 GFP Control 플레이트는 만약 형질전환이 실패한다면 모듈II에서 사용됩니다. 37도에서 하룻밤 배양하고 4도에서 보관해서 준비합니다.

실험 전 준비

모듈 I

GFP를 이용한 E.coli 형질전환

1. 항온 수조 온도를 37°C와 42°C로 맞춥니다. 배양기는 37°C로 설정합니다.
2. 각 그룹에 얼음을 준비합니다. 작은 얼음조각은 열충격 후에 박테리아를 빠르게 식히게 해줍니다.
3. CaCl₂(튜브 C) 0.5mL씩 10개의 원심 분리기 튜브에 나누는 후에 10개의 그룹에 나눠준 후 얼음에 꼽아 놓습니다.
4. Recovery Broth 1.5mL씩을 10개의 튜브에 나눠준 후 실온에 보관합니다.

For Module I, Each Group Requires:

- Sharing - one of five *E. coli* source plates
- 1 tube (0.5 mL) CaCl₂
- 1 tube pGFP plasmid DNA (12 µL)
- 1 tube (1.5 mL) "Recovery broth"
- 2 one-striped plates
- 1 two-striped plate
- 1 unstriped plate
- 4 sterile 1 mL pipets
- 3 sterile inoculating loops
- 1 microcentrifuge tube

pGFP 플라스미드 DNA 준비

5. pGFP 플라스미드(튜브 D)를 얼음에 꼽아둡니다.
6. 10개의 원심분리기 튜브에 "pGFP" 표기합니다.
7. pGFP 튜브 아래에 샘플이 잘 모여있는지 확인합니다.
8. 마이크로피펫을 사용해 12µL 씩 10개의 튜브에 분주하고 뚜껑을 닫아 얼음에 꼽아둡니다.

모듈 II

GFP 분리

1. Lysozyme(튜브 E)를 TEG 버퍼(튜브 F)에 모두 넣고 섞습니다. "Lysis Buffer"라고 표기합니다.
2. 위의 Lysis buffer 500µL를 튜브에 넣고 냉장고에 넣고 보관합니다.

For Module II, Each Group Requires:

- 2 plates of ReadyPour™ (LB) medium containing AMP/ IPTG
- 2 Inoculating loops
- 1 tube (500 µL) of Lysis Buffer
- Microcentrifuge tube
- Micropipettes and pipette tips

모듈 III

컬럼 용출 버퍼

1. 10X Column Elution Buffer(튜브 G) 35mL를 315mL의 증류수에 넣고 섞어 희석시킵니다.
2. 다음 단계의 Molecular sieve matrix 준비를 위해 위에서 희석한 버퍼 70mL를 따로 보관하고 남은 버퍼는 10개의 튜브에 25mL씩 나눠 담아 각 그룹에 나눠줍니다. 이 버퍼를

"1X Column Elution Buffer"로 튜브에 표기합니다. 사용하기 전까지 얼음에 보관합니다.

For Module III, Each Group Requires:

2	Screw-top microcentrifuge tubes
1	Chromatography column
1	Ring stand with clamp
1	Microtiter strip
6 mL	Molecular Sieve Matrix (hydrated H)
25 mL	1x Column Elution Buffer (diluted G)
220 µL	"GFP extract" (I) - if needed
	Adjustable volume micropipette & tips

Molecular Sieve Matrix 준비

3. Dry Molecular Sieve Matrix(튜브 H)에 위에서 준비해둔 1X Column Elution Buffer를 넣습니다.
4. 살살 흔들어서 섞은 후 30-60분 동안 배양하여 완전히 녹도록 합니다.
5. 10개 그룹에 6mL씩 나눠줍니다.

참고: 준비된 molecular Sieve Matrix는 즉시 사용하거나 최대 72시간 4°C에서 보관할 수 있습니다.

GFP를 포함한 대조 세포 추출

이 control extract는 모듈 I, 모듈 II에서 만족스럽지 못한 결과를 얻은 학생들이 사용할 수 있도록 제공됩니다.

6. 얼려진 GFP가 포함된 Control Cell Extract (튜브 I)를 상온에서 해동 후 얼음에 꽂아둡니다.
7. 10개의 튜브에 "GFP extract"로 표기하고 220µL 씩 넣습니다. 얼음에 꽂아두고 추출실험에 실패한 그룹만 모듈 III에서만 사용하십시오.

모듈 IV

동결건조된 단백질 마커(Molecular Weight Standard)와 단백질 용액 재구성

재수화 된 후 Protein Molecular Weight Standard(튜브 J)에는 6개의 웰에 로딩 할 수 있는 충분한 양이 들어 있습니다.

- 130 μL 의 증류수를 Protein Molecular Weight Standards(튜브 J)에 넣고 몇 분동안 수화되도록 합니다. 볼텍싱이나 흔들어서 혼합하십시오.
- 이 마커는 그룹이 공유해서 쓸 수 있습니다. 한 웰당 로딩하는 양은 20 μL 입니다.
- 재수정된 마커 샘플 중 사용 하고 남은 것은 -20°C 에서 보관할 수 있습니다.
- 선택사항: 50% Glycerol Solution(튜브 L)에 10X Gel Loading Solution 100 μL 을 추가합니다. 이 단계는 필수적이지 않지만 학생들이 그들의 샘플이 겔을 로딩하는동안 볼 수 있게 해 줍니다.
- 글리세롤 용액 50 μL 씩을 10개의 원심분리기 튜브에 담고 "Native Protein Solution" 또는 "Native"라고 표기합니다.
- Protein Denaturing Solution (튜브 K) 50 μL 씩 10개의 원심분리기 튜브에 분주합니다. "Denaturing"이라고 표기합니다.
- 실험시간을 절약하고 싶다면 물이 담긴 비커나 향온 수조를 미리 예열해 둡니다.

For Module IV, Each Group Requires:

1 Tube Protein Denaturing Solution (50 μL)
 1 Tube 50% Glycerol Solution (50 μL)
 Protein Standard markers (shared)

전기영동 버퍼 준비

1대 9의 비율로 Tris-Glycine-SDS 전기영동버퍼(10X)와 증류수를 섞어 준비합니다. 전기영동에 필요한 대략적인 용량은 다음의 Table B를 참조합니다. 버퍼는 겔이 담길정도의 양이어야 합니다.

실험시간에 맞게 Table A를 참고하여 전압을 설정합니다.

Table A Time and Voltage Guidelines		
Recommended Time		
Volts	Minimum	Optimal
100	70 min.	90 min.
125	50 min.	60 min.
150	40 min.	50 min.

Table B Tris-Glycine-SDS Electrophoresis Buffer			
EDVOTEK Model #	Conc. (10x) Buffer	Distilled Water	Total Volume
MV10	58 mL	522 mL	580 mL
MV20	95 mL	855 mL	950 mL

염색 및 염색 제거용 버퍼 준비

에탄올, 아세트산 수용액은 키트에 들어있는 Protein InstaStain®과 함께 염색과 탈색에 사용됩니다. 이 염색은 학생들이 사용하기에 안전하며 특수한 방식의 청소와 폐기 방법이 필요하지 않습니다.

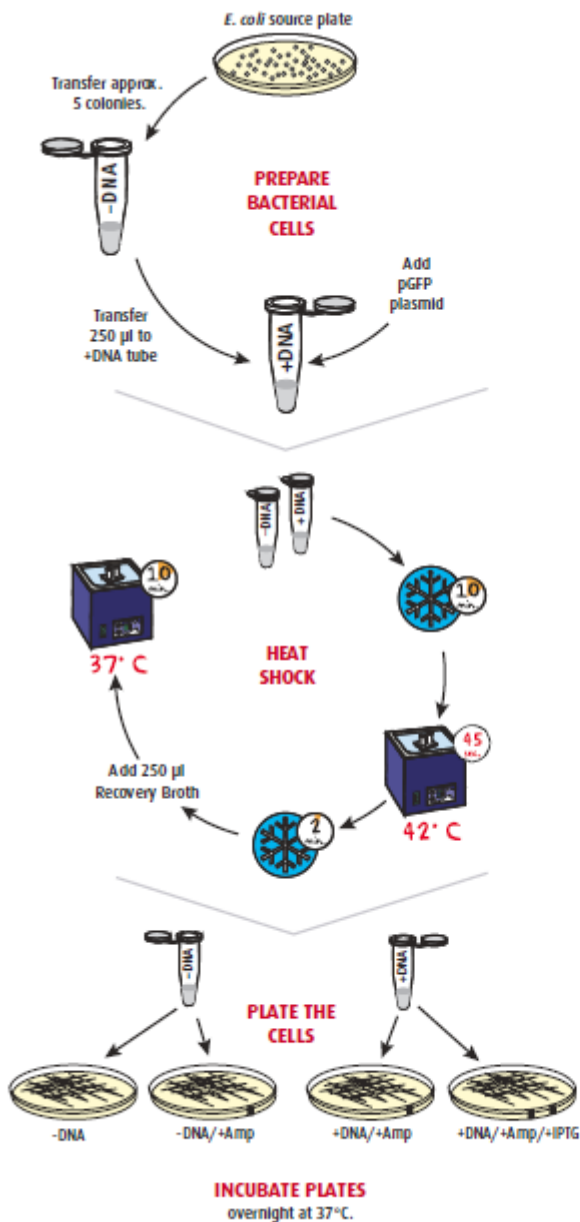
니다. Glacial Acetic Acid version(빙초산 류)은 더 어두운 단백질 밴드를 만드는 경향이 있음에도 그것 또는 식초는 버퍼에서 사용될 수 있습니다.

Glacial Acetic Acid를 사용할 수 있는 경우(권장):

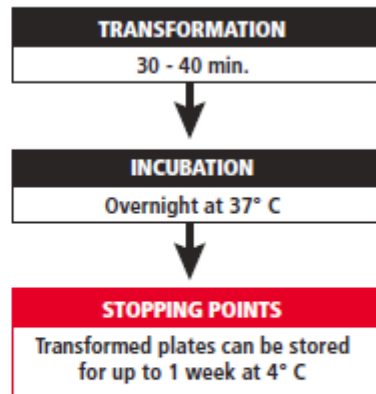
- 에탄올 180mL, 증류수 140mL, Glacial Acetic Acid 40mL를 혼합해 에탄올과 Glacial Acetic Acid 저장 용액을 준비합니다. 이 용액에 "Staining/Destaining Buffer"라고 표기합니다. 만약 이 방법을 사용하는 경우 최상의 결과를 위해 겔을 3시간 또는 하룻밤동안 염색하는 것이 좋습니다.

모듈 1 개요

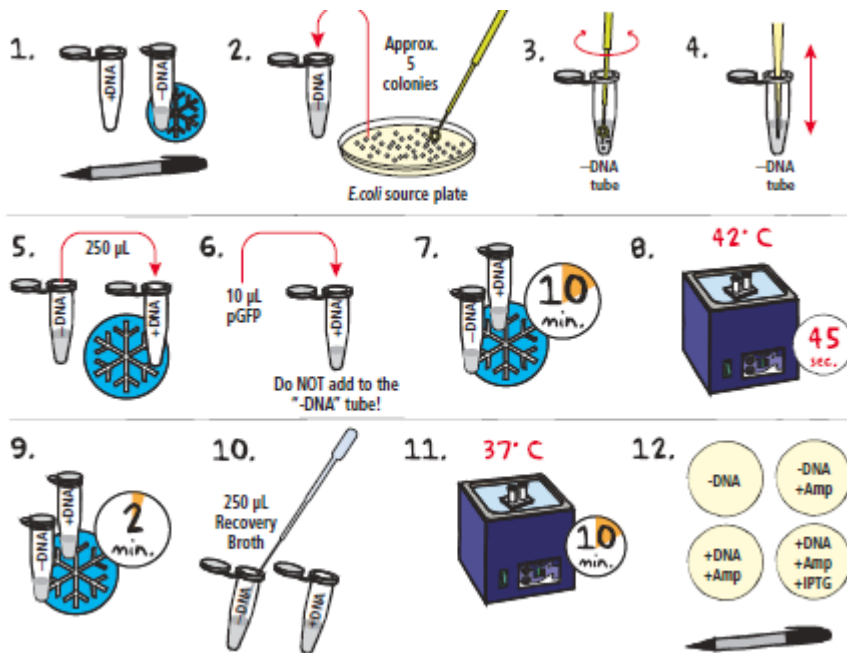
pGFP 플라스미드를 가진 GFP host E.coli 박테리아를 형질전환합니다. 박테리아는 18-22시간동안 "source plate"인 LB-agar에서 자라며 멸균된 루프로 수집되어 CaCl₂ 안에서 competent가 됩니다. 다음으로 플라스미드가 열충격을 받기 전에 세포의 절반에 추가됩니다. 마지막으로 박테리아는 LB-Agar플레이트에 올려지고 37°C에서 하룻밤동안 배양되기 전에 잠시 회복 될 것입니다.



TIMING REQUIREMENTS:



모듈 1: GFP를 가진 E.coli의 형질전환



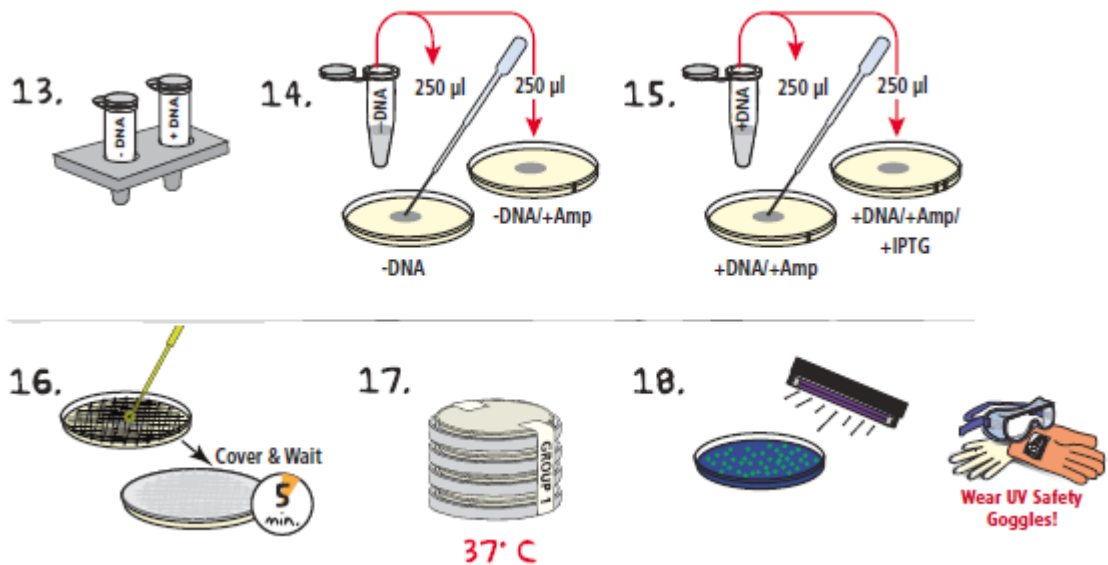
1. 차가운 CaCl₂가 들어있는 원심분리기 튜브에 "-DNA"라고 표기하고 빈 원심분리기 튜브에는 "+DNA"라고 표기합니다.
2. 멸균 접종 루프를 이용해 대략 5개의 잘 분리된 콜로니를 E.coli 소스플레이트에서 떼서 "-DNA" 튜브에 넣습니다.
3. 루프를 잡은 손가락을 돌려가며 원심분리기 튜브안에 모든 세포가 풀어지게 합니다.
4. CaCl₂ 용액 안에 있는 박테리아 세포를 피펫팅하여 잘 섞어서 세포 덩어리가 안보이고 흐려보일 때까지 반복합니다.
5. 위의 세포 현탁액 250µL을 "+DNA" 튜브에 넣고 "-DNA" 튜브와 함께 얼음에 꽂아둡니다.
6. pGFP DNA 10µL를 "+DNA" 튜브에 넣고 부드럽게 손가락을 튕겨가며 섞습니다. 이것은 "+DNA" 튜브에만 넣어야합니다. "-DNA" 튜브에는 넣지 마십시오.
7. 10분 동안 얼음에 두 개의 튜브를 넣어둡니다.
8. 42°C 항온수조에 45초 동안 담귀둡니다.
9. 45초가 지나자마자 얼음에 옮겨 2분간 놔둡니다.
10. 멸균된 피펫을 사용해 250µL Recovery Broth를 각 튜브에 넣고 잘 섞습니다.
11. 37°C의 항온수조에서 10분간 세포를 배양합니다.
12. 세포가 회복되는 동안 아래 처럼 4개의 Agar 플레이트 바닥에 표기합니다.

-DNA (줄무늬 표시 없는 플레이트)

-DNA/+AMP (한 개의 줄무늬가 표시된 플레이트)

+DNA/+AMP (한 개의 줄무늬가 표시된 플레이트)

+DNA/+AMP/+IPTG (두 개의 줄무늬가 표시된 플레이트)



13. 회복시기가 지나고 튜브를 항온수조에서 빼서 실험대에 위치시킵니다.

14. 멸균된 1mL 피펫을 사용하여 "-DNA" 튜브에서 회복된 세포 250µL를 "-DNA"와 "-DNA/+AMP" 각각의 플레이트 중앙으로 옮깁니다.

15. 새 멸균 1mL 피펫을 사용해 "+DNA" 튜브에서 회복된 세포 250µL를 "+DNA/AMP"와 "+DNA/+AMP/+IPTG" 각각의 플레이트 중앙으로 옮깁니다.

16. 루프를 사용하여 플레이트 전체에 세포를 도말(spreading)합니다. "-DNA"와 "+DNA"에 사용하는 루프는 각각 다른 루프를 사용해야 합니다. 세포가 플레이트 저체표면에 잘 퍼져있는지 확인한 후 뚜껑을 덮고 아가배지에 완전히 흡수될 때까지 5분간을 기다립니다.

17. 플레이트를 쌓아서 테이프로 붙입니다. 각 조마다 자신의 조를 표기합니다. 37°C에서 16-18시간 배양을 합니다. 인큐베이터가 없으면 실온에서 24-48시간이 콜로니 형성에 필요합니다.

18. 장파장 UV광원이 있으면 형질전환과 대조군 플레이트(control plate)를 관찰합니다.

- 플레이트에 있는 콜로니의 수
- 자외선 아래에서 박테리아의 색

참고: 가능하다면 사진을 찍습니다.

모듈 1: 실험 결과 분석

데이터 수집

1. 형질전환과 대조 플레이트의 결과를 관찰합니다.

대조군 플레이트: (-) DNA	형질전환 플레이트: (+)DNA
· -DNA	· +DNA/+AMP
· -DNA/+AMP	· +DNA/+AMP/IPTG

2. 플레이트를 관찰 후 다음 질문들에 답을 적습니다.
 - A. 얼마나 많은 박테리아 성장을 관찰하였습니까? 콜로니의총 개수를 적습니다.
 - B. 박테리아는 무슨색입니까?
 - C. 왜 다른 실험조의 학생들의 형질전환 효율성이 다르게 나타났습니까?
 - D. 만약 결과가 나오지않았다면 원인이 무엇입니까?

형질전환 효율성 계산

형질전환 효율은 플라스미드 1 μ g당 형질전환 된 세포 수의 정량적 계산입니다. 이것은 실질적인 형질전환실험의 성공을 나타내는 지표입니다. 실험에서 수집한 데이터를 사용하여 계산합니다.

1. "+DNA/+AMP/+IPTG"로 표기된 플레이트에서 콜로니 수를 세십시오. 마킹펜으로 플레이트 뚜껑에 하나씩 표시하면서 세는 것이 좋습니다.
2. 다음 식을 사용해 효율성을 계산합니다.

$$\frac{\text{형질전환 수}}{\text{DNA의 } \mu\text{g}} * \frac{\text{회복된 최종 부피}(ml)}{\text{플레이트 부피}(ml)} = \mu\text{g 당 형질전환된 수}$$

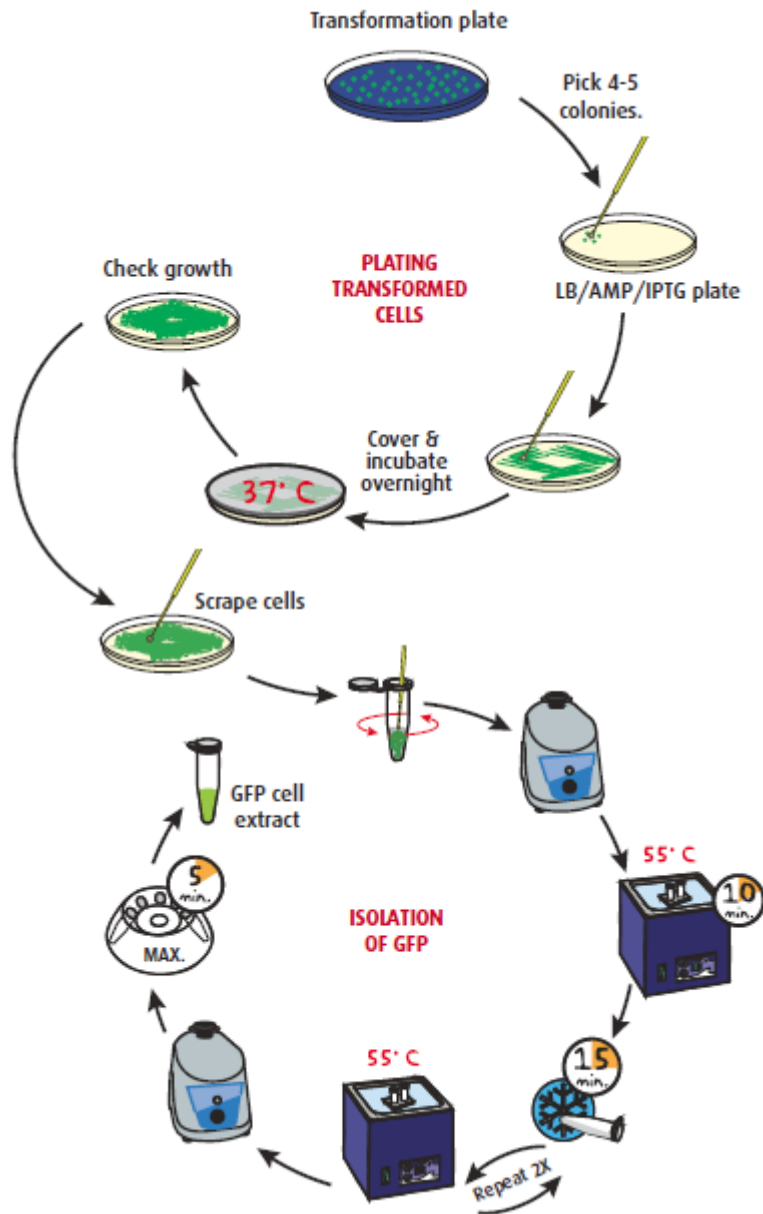
예) 대략 40개의 콜로니라는 가정하에, (0.05 μ g DNA 사용과, 마지막 부피 recovery 0.50mL, 플레이트 0.25mL)

$$\frac{40}{0.05\mu\text{g}} * \frac{0.5\text{mL}}{0.25\text{mL}} = 1600 (1.6 * 10^3)$$

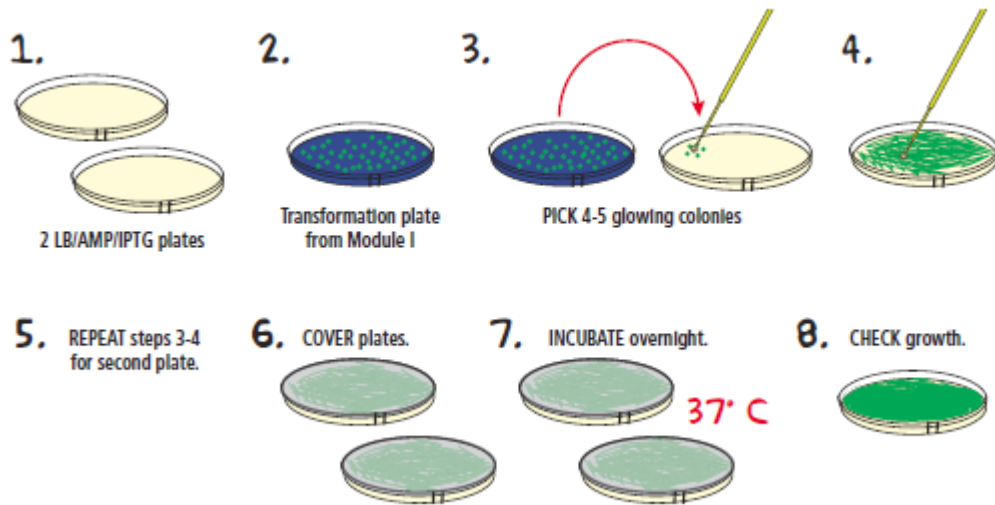
3. 각 실험조마다 계산된 형질전환 효율성을 비교합니다. 무엇이 각 조마다 실험결과를 다르게 나오게 했는지 토론합니다.

모듈 II 개요

모듈 I의 형질전환 플레이트에서 GFP 발현 콜로니를 수집하게 됩니다. 박테리아는 암피실린과 IPTG가 들어있는 LB-agar 플레이트에서 하룻밤동안 자라게 됩니다. 다음으로 나중에 정제용 GFP 방출을 위해 박테리아를 수집하고 용해합니다.



모듈 II : GFP 분리

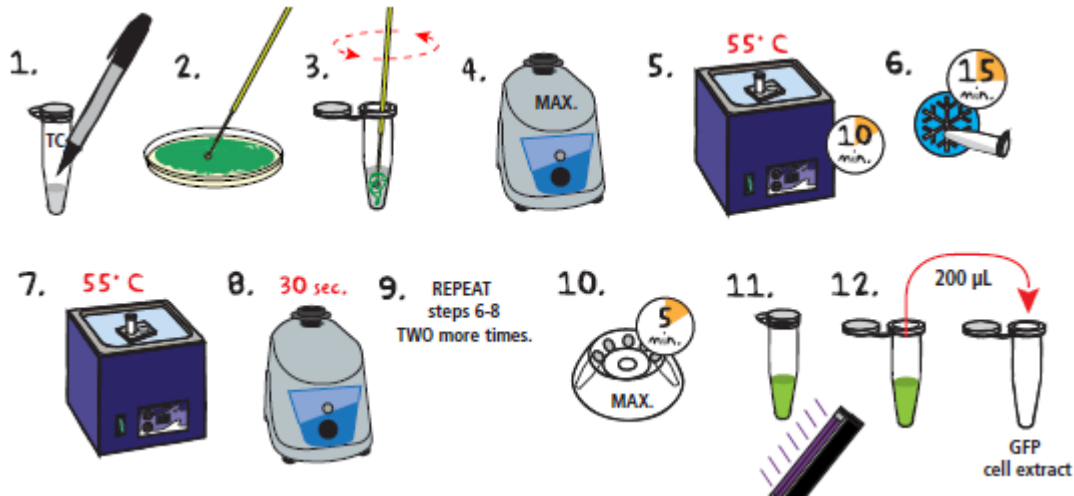


1. LB/AMP/IPTG 플레이트 2개를 준비합니다.
2. +DNA/AMP/IPTG 형질전환 플레이트(모듈I에서 얻은 플레이트)를 준비합니다. 다른 실험 조와 공유해도 됩니다.
3. 루프를 사용해 분리된 GFP 발현 콜로니를 4-5개를 옮깁니다.
4. 세포를 표면 전체에 골고루 도말합니다. 플레이트를 90° 돌려 다시 도말합니다.
5. 두 번째 플레이트에도 3-4단계를 반복합니다.
6. 뚜껑을 다시 덮습니다.
7. 37°C 인큐베이터에서 하룻밤 배양합니다.
8. 플레이트에 최소 1개이상의 포화된 세포군이 있는지 확인합니다. 하룻밤 배양 후 GFP분리를 합니다. 만약 배양 후 추가시간이 필요한 경우 4°C 비닐봉지에 최대 7일동안 보관 가능합니다.

주의: 절대로 24시간 이상 배양하지 않도록합니다.

참고: 형질전환에 실패한 경우 미리 만든 대조군 박테리아 플레이트를 사용합니다. 이것은 형질전환된 박테리아와 동일한 pGFP 플라스미드를 가지고 있습니다.

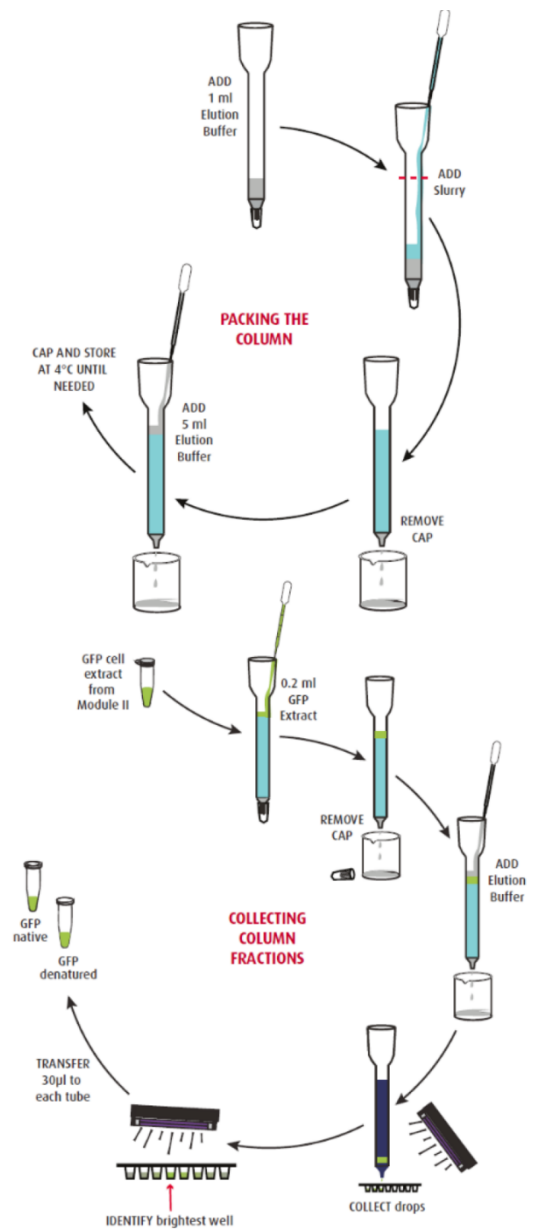
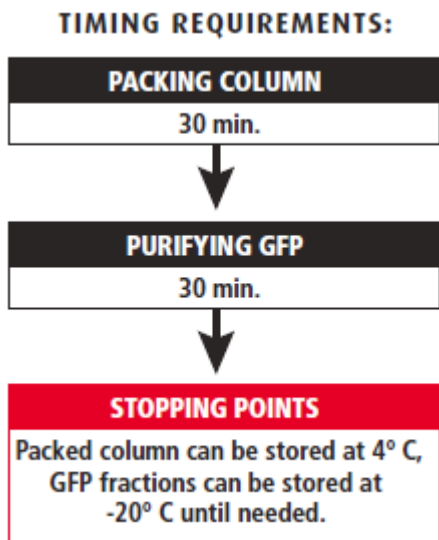
모듈 II: GFP 분리



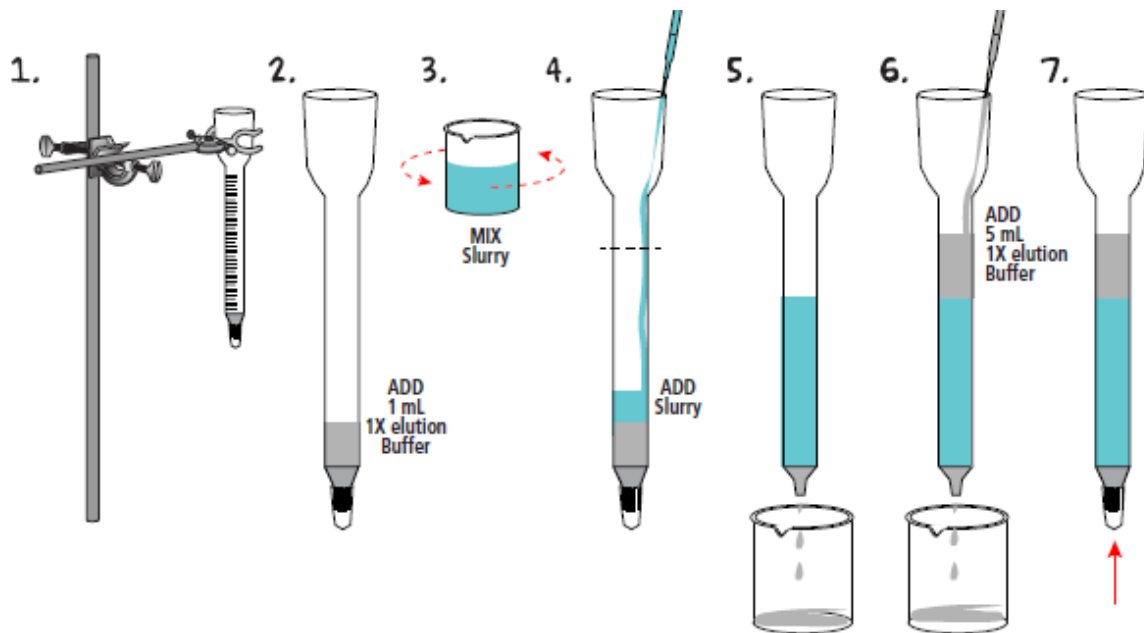
1. Lysis buffer가 들어있는 1.5mL 원심분리기 튜브에 자신의 이름을 적습니다.
2. 37°C에서 밤새 배양한 가장 발현이 잘된 GFP를 선택합니다. 루프를 사용해 조심스럽게 뜹니다.
3. Lysis buffer가 들어있는 튜브에 루프를 넣고 돌려가며 세포가 버퍼에 빠지게 합니다.
4. 볼텍스믹서 최대속도로 튜브에 들어있는 버퍼와 셀이 잘 섞이게 합니다. 세포가 충분히 풀려야합니다. 최대 1분동안 볼텍싱이나 피펫팅으로 충분히 풀어줍니다.
5. 55°C 수조에 10분 동안 튜브를 넣습니다.
6. GFP 세포가 들어있는 원심분리기 튜브를 -20°C냉동고에 빠른 냉각을 위해 눕혀서 10분간 보관합니다.
7. 세포 현탁액(cell suspension)이 완전히 동결된 후 냉동실에서 원심분리기튜브를 꺼내 55°C 수조에 넣어 해동시킵니다.
8. 샘플을 볼텍싱합니다.
9. 6-8번 과정을 두 번 더 반복합니다.
10. 원심분리기에 튜브를 넣고 최대 속도로 5분 동안 돌립니다. (원심분리기를 돌릴 때는 튜브를 대칭으로 넣고 균형을 맞춰서 돌립니다.)
11. 이 시점에서 상층액에 녹색형광 단백질이 있어야합니다. (UV 광원에서 밝은 녹색을 씩니다.) 만약 상층액이 형광을 띄지 않거나 세포 펠릿이 형광이면 5-10번 과정을 반복합니다.
12. 빛이 나오는 상층액(supernatant) 200µL을 튜브에 넣고 "GFP cell extract"라고 표기합니다. 추출물과 남은 상층액은 냉동고에 넣어 모듈 III에서 사용합니다.

모듈 III 개요

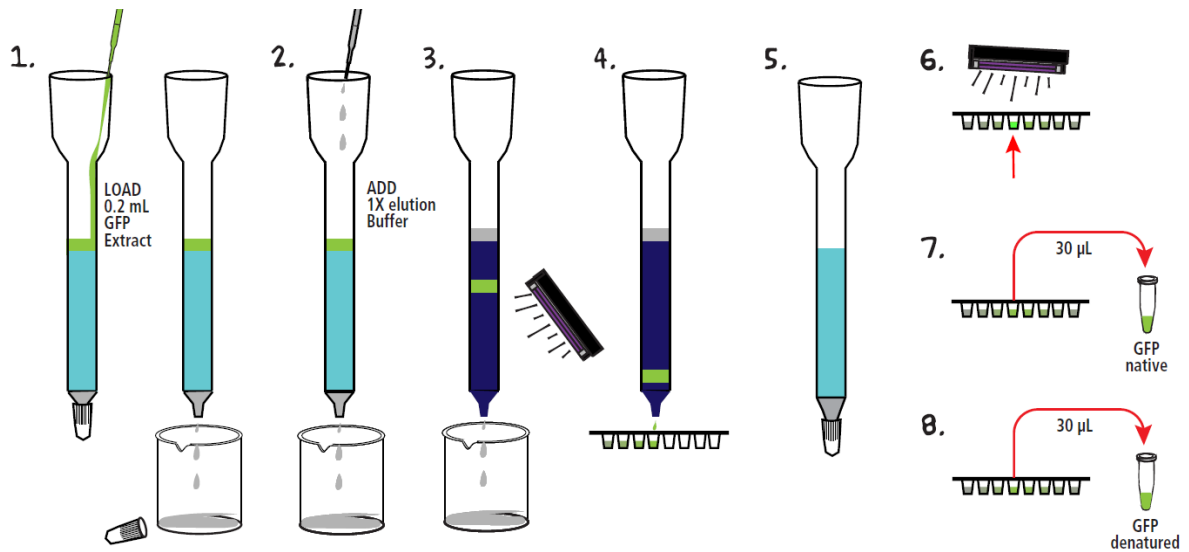
모듈 III에서는 모듈 II의 GFP를 가진 lysate를 컬럼크로마토그래피로 정제합니다. 우선 컬럼은 자체 매트릭스로 채워지고 세척버퍼로 평형화됩니다. 세포 용해물은 컬럼을 통과하고 GFP는 microtiter strip으로 수집됩니다. 고휘광 분석은 모듈 IV의 분석을 위해 보관됩니다.



모듈 III: 컬럼 크로마토графи를 이용한 GFP 정제



1. 링스탠드에 컬럼을 수직으로 고정합니다. 수직방향이 정확한지 확인하고 흰색 캡이 컬럼 바닥에 단단히 연결되어 있는지 확인합니다.
2. 1X elution buffer(용출 버퍼) 1mL 를 추가하고 하단 캡에서 새어 나오지 않는지 확인합니다.
3. Molecular sieve matrix 를 부드럽게 저어줍니다.
4. 4mL 를 컬럼의 내부 벽을 타고 아래로 흐르게하여 조심스럽게 넣습니다. 컬럼을 채우는 중간에 공기방울이 생기면 잠시 멈추고 컬럼 측면을 쳐서 공기방울이 없어지고 난 후 다시 붓습니다.
5. 컬럼 아래에 빈 비커를 놔두고 아래의 뚜껑을 빼내고 1X elution buffer 를 떨어뜨려 모읍니다. 컬럼 하단으로 매트릭스가 채워지게 합니다. 참고: 컬럼의 좁은 몸통 부분의 2/3 가량이 채워져야 합니다. 부족하면 더 채우도록 합니다.
6. 1X elution buffer 5mL 를 추가하여 컬럼을 세척합니다. 건조되는 것을 방지하기 위해 매트릭스위에 얇은 층의 elution buffer 를 유지합니다.
7. 뚜껑을 아래 구멍에 다시 끼우고 새어 나오지 않는지 확인합니다.

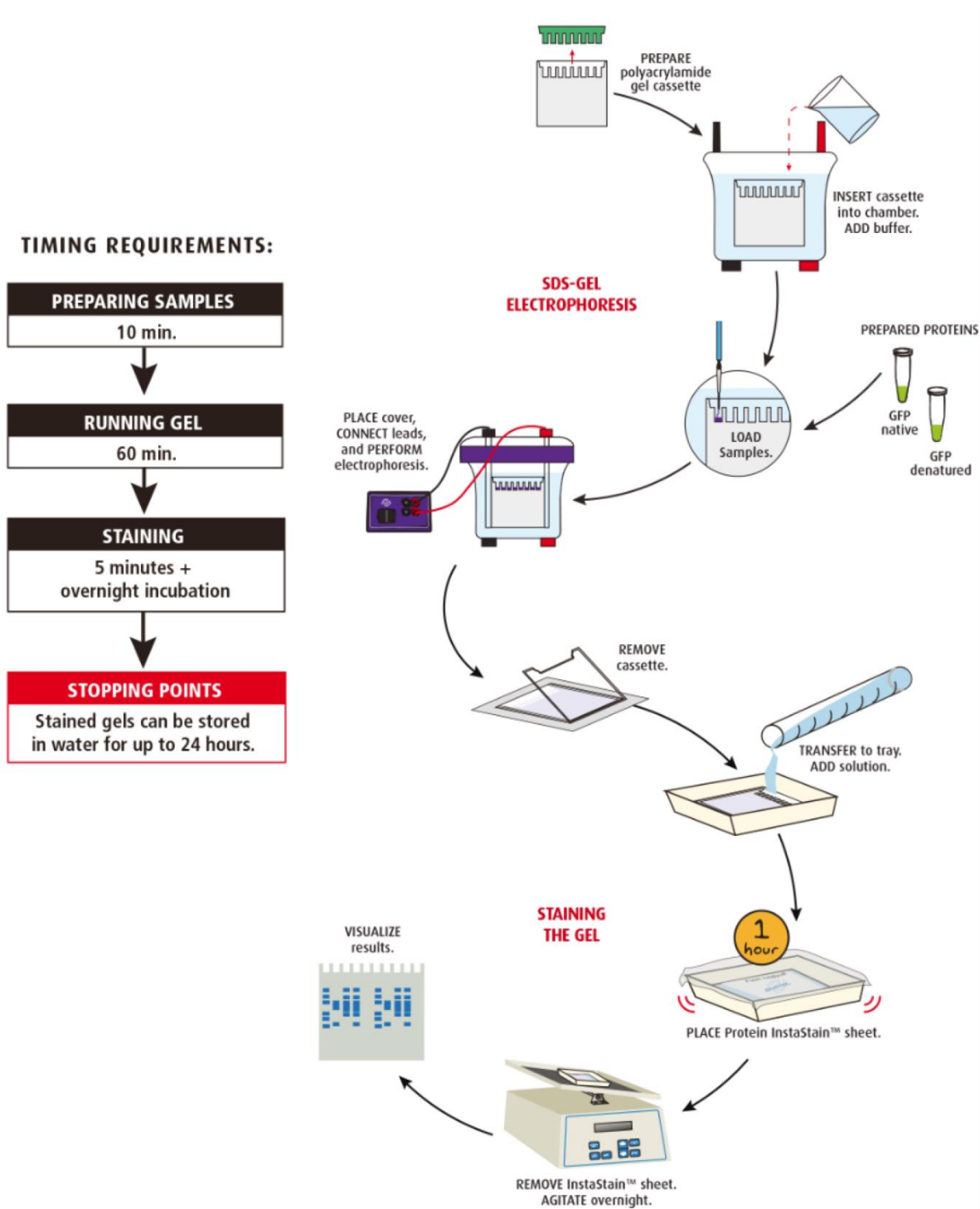


GFP 단백질 컬럼 분획 수집

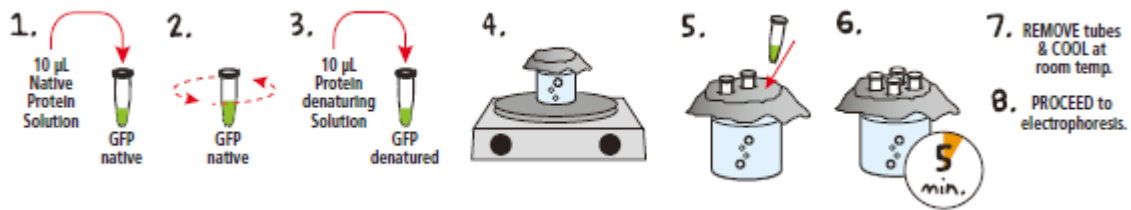
1. 모듈 II 에서 보관한 GFP 추출물 0.2mL 를 컬럼으로 천천히 넣습니다. 아래 뚜껑을 빼서 추출물이 완전히 들어가도록 하고 떨어지는 용액을 비커에 모아둡니다. 참고: 모듈 II 에서 GFP 추출을 못했다면 미리 만들어둔 Control Cell Extract 를 사용합니다.
2. 1X elution buffer 로 컬럼을 용리(elute)하기 시작합니다. 단백질 샘플이 희석되지 않도록 버퍼를 천천히 추가합니다. (한 번에 여러 방울). 절대 컬럼을 건조하게 만들지 마십시오.
3. UV 장파장으로 컬럼을 비춰 겔 매트릭스에서 GFP 의 진행상황을 관찰합니다. (실험실 조명을 어둡게 하고 보는 것이 좋습니다.) 컬럼이 아래 비커로 배수가 되도록 합니다.
4. GFP 단백질 밴드가 컬럼의 바닥(프릿 frit 가까이)에 도달하면 microtiter plate 에 수집을 시작합니다. 각 웰당 4 방울을 왼쪽에서부터 오른쪽 웰까지 모으도록 합니다. 참고: GFP 단백질의 손실을 방지하기위해 GFP 가 컬럼 밑바닥에 도달하기 전에 수집을 시작해야합니다.
5. GFP 가 완전히 용출될 때까지 컬럼에서 GFP 의 진행상태를 계속 모니터링하고 분획을 수집합니다. 그런 다음 컬럼의 뚜껑을 닫고 따로 보관이 가능합니다.
6. UV 광원을 통해 microtiter plate 의 분획을 확인합니다. 가장 밝은 수준의 형광 단백질을 포함하는 웰을 가려냅니다.
7. 가장 밝은 용출액 30µL 를 원심분리기 튜브에 넣고 "GFP native"라고 표기합니다.
8. 동일한 용출액 30µL 을 두 번째 원심분리기 튜브에 넣고 "GFP denatured"라고 표기합니다.

모듈 IV 개요

GFP 분획은 SDS-PAGE 를 이용해 분석됩니다. "Native" 샘플은 글리세롤 혼합물과 섞이고 "Denatured" 샘플은 denaturing 용액과 섞여져 가열됩니다. 그리고 나서 두 샘플은 SDS-PAGE 겔을 통해 분석됩니다.



모듈 IV: SDS-Gel 전기영동을 이용한 GFP 분석



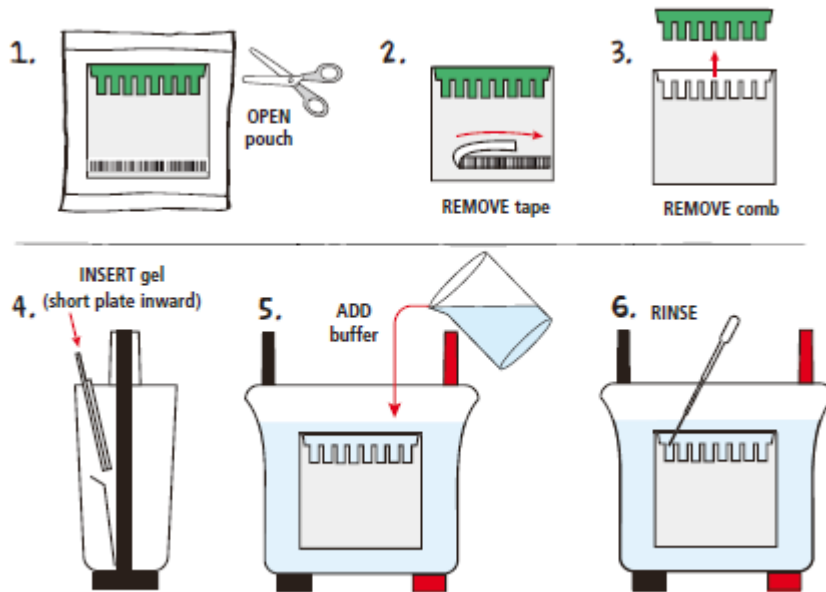
Native Protein 준비 (비가열)

1. 10µL Native Protein 용액을 "GFP native" 튜브에 넣습니다.
2. 잘 섞어서 전기영동을 위해 따로 놓아둡니다.

변성된 단백질 준비 (가열)

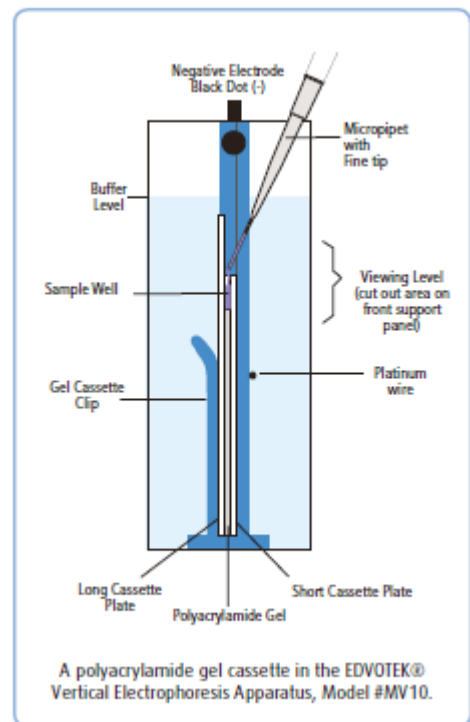
3. 단백질 샘플 변성을 위해 10µL의 단백질 변성 용액을 "GFP denatured"라고 표기한 원심분리기 튜브에 넣고 잘 섞습니다. 변성 용액에는 SDS(Sodium dodecyl sulfate)와 2-mercaptoethanol이 포함되어 있습니다.
4. 물이 담긴 비커에 알루미늄 호일을 덮고 핫플레이트에서 가열합니다. 참고: 단백질 샘플을 가열하기 위해 핫플레이트 대신에 95-100°C 항온수조를 사용할 수 있습니다.
5. 변성될 GFP 샘플 튜브의 바닥을 호일을 통과해 삽입하여 끓는 물에 담급니다. 이 튜브는 호일에 계속 매달려있게 합니다. 참고: 샘플 튜브 뚜껑이 제대로 닫혀있는지 확인해야 합니다. (샘플이 -20°C에서 보관되고 있었다면 우선 녹여줍니다)
6. GFP 샘플을 5분 동안 끓입니다.
7. 비커에서 샘플 튜브를 빼내서 상온에 몇 분간 식힙니다. 참고: UV 광원으로 관찰하면 녹색빛이 나지 않으면 변성에 성공한 것입니다.

모듈 IV: Denaturing SDS-Gel 전기영동으로 GFP 분석

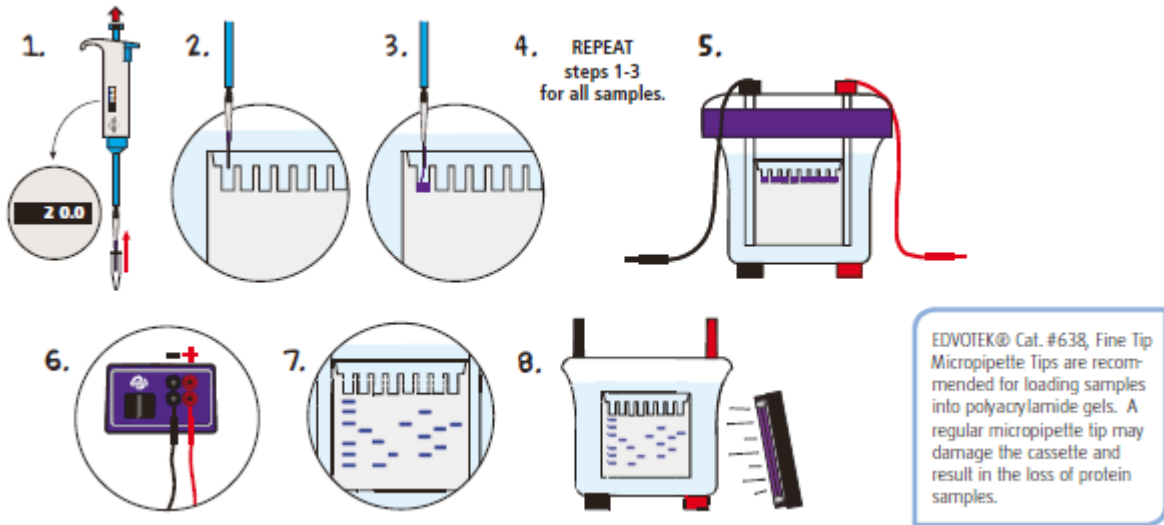


PAGE Gel 과 챔버 준비

1. 겔 카세트가 들어있는 봉지를 뜯습니다. 겔을 빼내서 짧은 앞 판이 위를 향하게 벤치 위에 올립니다.
2. 겔의 전면 하단에 스티커나 테이프가 붙어 있는 경우도 있습니다. 테이프를 제거합니다.
3. 꼽혀있는 comb 을 빼냅니다. 이 때 겔의 well 이 손상되지 않게 주의합니다.
4. 겔을 챔버에 삽입합니다. 겔의 제조업체마다 겔의 방향이 다를 수 있습니다. Edvotek 챔버의 경우 짧은 플레이트가 내부를 향해야 합니다.
5. 희석된 전기영동버퍼를 챔버에 넣습니다. 버퍼는 앞쪽의 짧은 플레이트 상단까지 올라와야 합니다.
6. 피펫을 사용해 채워진 버퍼로 겔의 각 웰마다 행귀줍니다.



모듈 IV: Denaturing SDS-Gel 전기영동으로 GFP 분석



단백질 샘플 로딩

최대 4 명이 한 개의 겔을 공유할 수 있습니다. 일부 샘플은 SDS 와 2-mercaptoethanol 를 가진 변성용액이 포함되어 있습니다. 장갑과 UV 프로텍트 고글을 착용합니다.

1. Table 1.을 참고하면서 각 웰마다 마이크로 피펫으로 20µL 씩 로딩합니다.
2. 피펫팁을 버퍼 안으로 집어넣어 샘플의 웰 바로 위에 놓고 겔 카세트의 후면 플레이트에 부드럽게 위치시킵니다.
3. 피펫 스위치를 천천히 눌러 샘플을 웰에 주입합니다.
4. 다른 샘플들도 이와 같은 방법으로 웰에 주입합니다.

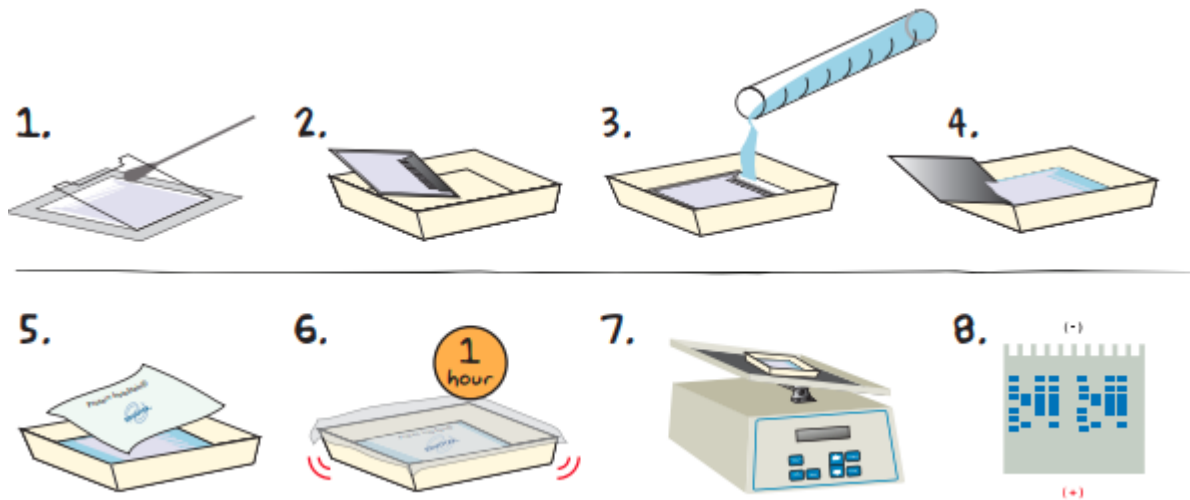
주의: 각 샘플마다 피펫팁 교체를 꼭 하십시오!!

5. 샘플이 모두 로딩되면 챔버 뚜껑을 닫습니다.
6. 전원 공급장치에 선을 연결합니다.
7. Table A 를 참고하여 전압과 시간을 설정하여 전기영동을 진행합니다.
8. 전기영동이 완료되면 전원을 끄고 선을 분리하고 뚜껑을 엽니다. 겔을 챔버에서 빼내도록 합니다.

Lane	Sample	Time Boiled
1	Standard Protein Marker	5 min.
2	GFP Native (Group 1)	Not Boiled
3	GFP Denatured (Group 1)	5 min.
4	GFP Native (Group 2)	Not Boiled
5	GFP Denatured (Group 2)	5 min.
6	Standard Protein Marker	5 min.
7	GFP Native (Group 3)	Not Boiled
8	GFP Denatured (Group 3)	5 min.
9	GFP Native (Group 4)	Not Boiled
10	GFP Denatured (Group 4)	5 min.

Volts	Recommended Time	
	Minimum	Optimal
100	70 min.	90 min.
125	50 min.	60 min.
150	40 min.	50 min.

모듈 IV: Denaturing SDS-Gel 전기영동으로 GFP 분석



겔 염색

1. 전기영동을 마친 후 카세트를 꺼내어 실험대에 올려놓고 드라이버 같은 약간 날카로운 기구를 사용하여 겔 카세트의 모서리 부분으로 넣어 벌립니다. 전면 플레이트를 올라가며 겔을 분리하여 후면 플레이트에 남아있게 합니다. 이 때 겔은 찢어지기 쉽기에 조심스럽게 다루도록 합니다.
 2. 겔이 올려진 뒷면 플레이트를 깨끗한 트레이로 옮깁니다.
 3. 겔을 덮을 만큼 충분한 양(약 100mL)의 염색/탈색 용액을 붓습니다.
 4. 뒷면 플레이트만 조심스럽게 제거하고 트레이에 겔은 남겨둡니다. 만약 겔이 플레이트에 달라 붙어있으면 염색/탈색 용액을 피펫으로 떨어뜨려가며 부드럽게 겔이 미끄러지게 합니다.
 5. 염색/탈색 용액 표면위에 Protein InstaStain 용지를 띄워 놓습니다.
 6. 용액이 증발하지않게 비닐랩으로 씌워 1 시간 가량 놔둡니다. 염색이 잘 스며들게 중간중간 트레이를 흔들어 주는 것이 좋습니다.
 7. 교반기를 사용해 2-3 시간 동안 교반합니다. 겔을 밤새 담귀놓고 염색을 한다면 더 좋은 결과를 얻을 수 있습니다. 다음날에 염색/탈색 용액을 보충해주는 것도 좋습니다.
 8. 염색 후 단백질 밴드는 밝은 배경을 통해 결과물을 잘 관찰할 수 있습니다.
- *만약 겔이 너무 어두우면 실온에서 새로운 염색/탈색 용액으로 교체 후 교반기를 돌려 탈색을 더하도록 합니다.